植物提取物及其复合物对鸡源致病菌的体外抑菌作用

赵露露　廖秀东　张丽阳　罗绪刚　吕　林*

（中国农业科学院，北京畜牧兽医研究所，100193）

摘　要：本研究选取 10 种具有较强抑菌作用的植物提取物，研究其对鸡源致病菌（鸡大肠杆菌和鸡沙门氏菌）的体外抑菌作用，并分别筛选出对 2 种致病菌有较强抑菌作用的 3 种植物提取物，将其按不同比例复配，以获得抑菌效果更强的复合植物提取物。本研究分为 2 个试验。试验 1：共设 11 个组，分别为百里香精油、牛至精油、肉桂精油、大蒜油、黄芩黄酮、竹叶黄酮、黄芪多糖、小檗碱、苦参碱和绿原酸和金霉素组（阳性对照组），每组 6 个重复，采用牛津杯法测定植物提取物对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌作用。试验 2：根据试验 1 的结果，选取对大肠杆菌抑菌效果较好的肉桂精油、苦参碱和绿原酸 3 种植物提取物，分别按照不同浓度比例进行两两和 3 种植物提取物复配，用牛津杯法测定复合物对大肠杆菌的抑菌作用，同时分别设相应浓度的 3 种单一植物提取物为对照组，共 20 个组，每组 6 个重复；选取对沙门氏菌抑菌效果较好的竹叶黄酮、黄芩黄酮和肉桂精油 3 种植物提取物，用牛津杯法测定不同浓度比例的复合物和相应浓度的单一植物提取物（对照组）对沙门氏菌的抑菌作用，共 17 个组，每组 6 个重复；根据以上结果，研究了竹叶黄酮和肉桂精油按不同浓度比例复配对沙门氏菌的抑菌作用，以筛选最佳复配比例，共 15 个组，每组 6 个重复。结果表明：5 种植物提取物对大肠杆菌有抑菌作用，其抑菌作用从大到小依次为肉桂精油、苦参碱、绿原酸、百里香精油、牛至精油；8 种植物提取物对沙门氏菌有抑菌作用，其抑菌作用从大到小依次为竹叶黄酮、黄芩黄酮、肉桂精油、苦参碱、绿原酸、牛至精油、百里香精油、大蒜油。与肉桂精油对照组相比，肉桂精油、苦参碱和绿原酸两两或 3 种植物提取物复配不能显著增强对大肠杆菌的抑菌作用（$P>0.05$）；竹叶黄酮和肉桂精油复配可显著增强对沙门氏菌的抑菌作用，且在浓度比例为 25:150（1:6）时抑菌作用达到最大（$P<0.05$）。由此可见，10 种植物提取物中，对大肠杆菌抑菌效果较好的 3 种植物提取物为肉桂精油、苦参碱和绿原酸，但这 3 种植物提取物复合物的抑菌作用并不大于单一肉桂精油；对沙门氏菌抑菌效果较好的 3 种植物提取物为竹叶黄酮、黄芩黄酮和肉桂精油，竹叶黄酮和肉桂精油复配增强了抑菌效果，且复配比例为 1:6 时对沙门氏菌的抑菌作用最大。

关键词：植物提取物；大肠杆菌；沙门氏菌；抑菌作用

中图分类号：S816.7

据不完全统计，鸡细菌性疾病占 30%～40%，并且呈上升趋势，而在众多的细菌性疾病中，尤以大肠杆菌病和沙门氏菌病最为严重[1]，其发病率和死亡率高，造成的损失较大，被认为是危害养鸡业的主要细

收稿日期：2017-03-06

基金项目：公益性行业（农业）科研专项（201401047）；国家现代农业产业技术体系岗位专家专项经费（CARS-42）；中国农业科学院科技创新工程专项经费（ASTIP-IAS08）

作者简介：赵露露（1990—），女，河南郑州人，硕士研究生，动物营养与饲料科学专业。E-mail: 2544884102@qq.com

*通信作者：吕　林，副研究员，硕士生导师，E-mail: lulin1225@163.com

菌性疾病。目前，对鸡细菌性疾病的防治主要是依靠抗生素，但长期大量使用抗生素带来的耐药性问题和鸡肉食品安全问题日益突出。因此，有待开发抗菌活性高、低毒性、低残留、广谱的饲料添加剂以控制和预防肉鸡细菌多重感染性疾病的发生。植物提取物是以物理、化学和生物学手段从植物中提取的活性成分，其含量相对稳定、成分明确、可测定，对动物和人类的毒副作用小。植物提取物具有抗微生物和抗氧化功能，能提高动物肠道健康和机体免疫功能，因其安全、高效、稳定和可控的特性，在动物生产中受到了广泛地关注[2]。目前，研究报道较多的天然植物提取物主要有皂甙、生物碱、多糖、茶多酚、黄酮类、挥发油（精油）等[3]。我国农业部允许在动物养殖中使用的植物提取物饲料添加剂包括：糖萜素、苜蓿提取物、杜仲叶提取物、大豆黄酮、紫苏籽提取物等。天然植物提取物除了可以通过调节机体的免疫功能起抗菌和抗病毒作用外，还对病原微生物有直接作用。研究表明，植物类挥发油、黄酮、多糖能体外抑制鸡源性病原菌[4-11]。已报导的具有较强抑菌作用的天然植物提取物主要有百里香精油、牛至精油、肉桂精油、大蒜油、黄芩黄酮、竹叶黄酮、黄芪多糖、小檗碱、苦参碱等。目前，关于不同植物提取物对不同病菌抑菌作用的研究报道较多，且具有抑菌效果的植物提取物较多。但由于试验条件不一致、植物提取物来源不同、供试菌菌种不同、研究方法不一致，得到的抑菌效果也有所不同。另外，关于植物提取物对鸡源致病菌体外抑菌效果的研究较少，且哪种植物提取物对鸡源致病菌的抑菌效果更好，还没有进行系统的研究。而且，关于植物提取物复合物的体外抑菌作用研究，目前国内外的报道还非常少。本研究选择已报道的具有较强体内和体外抑菌作用的 10 种植物提取物，研究其对鸡源致病菌（鸡大肠杆菌和鸡沙门氏菌）的抑菌作用，并从中分别筛选出对 2 种鸡源致病菌具有较强抑菌能力的 3 种植物提取物，将这些植物提取物进行复配，研究其复合物对 2 种鸡源致病菌的抑菌作用，进而获得比单一植物提取物抑菌能力更强的复合物，为下一步进行植物提取物对肉鸡的体内有效性评价试验和进而开发可替代抗生素的饲料添加剂以抑制致病菌生长、提高动物免疫力、预防鸡疾病发生提供科学试验依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

植物提取物：百里香精油（纯度为 100%），购自上海回恩国际贸易有限公司；牛至油（纯度为 100%），购自吉安盛海天然植物油有限公司；肉桂精油（纯度为 100%），购自吉安市盛海天然植物油有限公司；大蒜油（纯度为 100%），购自上海双源大蒜油有限公司；黄芩黄酮（纯度为 80%），由陕西弗森生物技术有限公司提供；竹叶黄酮（纯度为 40%），购自浙江圣氏生物科技有限公司；黄芪多糖（纯度为 50%），购自成都锦泰和医药化学技术有限公司；小檗碱（纯度为 97%），购自陕西森弗生物技术有限公司；苦参碱（纯度为 98%），购自陕西弗森生物技术有限公司；绿原酸（纯度为 60%），由山东禾本堂生物科技有限公司提供。

鸡源致病菌菌种：鸡大肠杆菌（CVCC 1569）和鸡白痢沙门氏菌（CVCC 79301）均购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心。

主要试剂：蛋白胨（生化试剂，北京奥博星生物技术有限责任公司）、牛肉膏（生化试剂，北京奥博星生物技术有限责任公司）、琼脂粉（生化试剂，北京奥博星生物技术有限责任公司）、氯化钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）、水解酪蛋白（MH）培养基（生化试剂，北京奥博星生物技术有限责任公司）、盐酸金霉素[美国药典（USP）级，上海阿拉丁生化科技有限公司]。

主要仪器：YT-CJ-1N 型超净工作台（北京亚泰科隆仪器技术有限公司）、隔水式电热恒温培养箱（上海跃进医疗器械厂）、立式压力蒸汽灭菌器（上海博迅实业有限公司）。

1.2 试验方法

1.2.1 植物提取物对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌作用

试验共设 11 个组，分别为百里香精油、牛至精油、肉桂精油、大蒜油、黄芩黄酮、竹叶黄酮、黄芪多糖、小檗碱、苦参碱、绿原酸和金霉素（阳性对照）组，每组 6 个重复。植物提取物的浓度根据其溶解度及在不同浓度下的抑菌能力大小来确定。

牛津杯法测定植物提取物的抑菌圈直径[7]：将已制备好的菌悬液用无菌生理盐水稀释到 10^6 CFU/mL，取 200 μL 均匀涂布于 MH 琼脂平板培养基表面，再在培养基表面垂直摆放牛津杯（每个直径为 9 cm 的培养皿上放 4 个牛津杯），轻轻按压，使其与培养基接触无空隙。然后往其中 3 个杯中加入 100 μL 的植物提取物溶液，即为 3 个平行，另外 1 个杯中加入生理盐水作为空白对照。然后置于 37 ℃恒温培养箱中培养 24 h，用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.2.2 植物提取物复配对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌作用

植物提取物复配对大肠杆菌的抑菌作用：采用单因子完全随机试验设计。根据以上单一植物提取物对大肠杆菌的抑菌作用，选出对大肠杆菌抑菌效果较好的 3 种植物提取物（肉桂精油、苦参碱和绿原酸）进行复配试验。由于肉桂精油对大肠杆菌的抑菌效果明显好于苦参碱和绿原酸，因此将肉桂精油的复配浓度设为 25 mg/mL（抑菌效果较好，且浓度较低），并根据其他 2 种植物提取物的溶解度（苦参碱饱和溶液浓度为 50 mg/mL，绿原酸饱和溶液浓度为 200 mg/mL）及其在不同浓度下的抑菌效果（表 1）来设置它们的复配浓度。具体处理安排如下：设 25 mg/mL 的肉桂精油、25 和 50 mg/mL 的苦参碱及 50、100 和 200 mg/mL 的绿原酸组作为对照组，将肉桂精油与苦参碱的复配比例设为 1:1（浓度比 25:25）、1:2（浓度比 25:50）；肉桂精油与绿原酸的复配比例设为 1:1（浓度比 25:25）、1:2（浓度比 25:50）、1:4（浓度比 25:100）、1:8（浓度比 25:200）；肉桂精油、苦参碱与绿原酸的复配比例设为 1:1:1（浓度比 25:25:25）、1:1:2（浓度比 25:25:50）、1:1:4（浓度比 25:25:100）、1:1:8（浓度比 25:25:200）、1:2:1（浓度比 25:50:25）、1:2:2（浓度比 25:50:50）、1:2:4（浓度比 25:50:100）、1:2:8（浓度比 25:50:200），共 20 个组，每组 6 个重复。

植物提取物复配对沙门氏菌的抑菌作用：采用单因子完全随机试验设计。根据以上单一植物提取物对沙门氏菌的抑菌作用，选取竹叶黄酮、黄芩黄酮和肉桂精油 3 种植物提取物进行复配试验。由于竹叶黄酮对沙门氏菌的抑菌效果明显好于黄芩黄酮和肉桂精油，因此将竹叶黄酮的复配浓度设为 25 mg/mL（抑菌

效果较好，且浓度较低），并依据黄芩黄酮的饱和溶液浓度（50 mg/mL）及 3 种植物提取物在不同浓度下的抑菌效果（表 2）来设置它们的复配浓度。具体处理安排如下：设 25 mg/mL 的竹叶黄酮、25 和 50 mg/mL 黄芩黄酮及 25、50 和 100 mg/mL 肉桂精油组作为对照组，将竹叶黄酮与黄芩黄酮的复配比例设为 1:1（浓度比 25:25）、1:2（浓度比 25:50），竹叶黄酮与肉桂精油的复配比例设为 1:1（浓度比 25:25）、1:2（浓度比 25:50）、1:4（浓度比 25:100），竹叶黄酮、黄芩黄酮与肉桂精油的复配比例设为 1:1:1（浓度比 25:25:25）、1:1:2（浓度比 25:25:50）、1:1:4（浓度比 25:25:100）、1:2:1（浓度比 25:50:25）、1:2:2（浓度比 25:50:50）、1:2:4（浓度比 25:50:100），共 17 个组，每组 6 个重复。另外，在随后探索竹叶黄酮与肉桂精油对沙门氏菌抑菌作用的最佳复配比例时，设 25 mg/mL 的竹叶黄酮及 100、125、150、175、200、225 和 250 mg/mL 肉桂精油组作为对照组，竹叶黄酮与肉桂精油的复配比例设为 1:4（浓度比 25:100）、1:5（浓度比 25:125）、1:6（浓度比 25:150）、1:7（浓度比 25:175）、1:8（浓度比 25:200）、1:9（浓度比 25:225）、1:10（浓度比 25:250），共 15 个组，每组 6 个重复。

1.2.3 植物提取物和抗生素溶液的制备

根据植物提取物和盐酸金霉素的有效成分含量，用吐温-80 或无菌水稀释，百里香精油[12]、牛至油[13]、肉桂油[14]和大蒜油用 2%吐温-80 作稀释剂，黄芩黄酮[15]、竹叶黄酮[16]、黄芪多糖[17]、小檗碱[18]、绿原酸[19]、苦参碱[20]和盐酸金霉素用无菌水做稀释剂。

1.2.4 培养基的制备

抗菌药物敏感性试验采用 MH 培养基[21-22]，细菌培养及计数采用营养肉汤培养基和营养肉汤琼脂培养基[23]。

1.2.5 供试菌液的制备

菌悬液的制备参照程桂林等[4]的方法进行。

1.2.6 数据统计分析

试验数据采用 SAS 9.0 软件进行统计分析。采用一般线性模型（GLM）程序进行方差分析，差异显著者，以最小显著差异（LSD）法比较各平均值间的差异显著性。以 $P<0.05$ 作为本研究中各项数据的差异显著性检验水平。

2 结　果

2.1 植物提取物对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌作用

10 种植物提取物对大肠杆菌的抑菌圈直径结果（表 1）表明，肉桂精油、苦参碱、绿原酸、百里香精油和牛至精油对大肠杆菌具有抑菌作用，随着植物提取物浓度的增加，抑菌圈直径逐渐增大，而大蒜油、竹叶黄酮、黄芩黄酮、小檗碱和黄芪多糖对大肠杆菌无抑菌作用。以同一浓度下比较抑菌圈直径大小为原则，发现这几种植物提取物的抑菌能力由大到小依次为肉桂精油、苦参碱、绿原酸、百里香精油、牛至精油。

表 1　植物提取物对大肠杆菌的抑菌圈直径

Table 1　Inhibition zone diameters of plant extracts on the *Escherichia coli*　　　mm

项目 Items	不同浓度 Different concentrations/(mg/mL)							
	800	400	200	150	100	50	25	10
百里香精油 Thyme oil	12.68	10.60	8.62					
牛至精油 Oregano essential oil	11.06	10.26	9.60					
绿原酸 Chlorogenic acid			11.55	10.47	9.23	7.85		
肉桂精油 Cinnamon essential oil					25.71	23.52	21.22	
苦参碱 Matrine						12.56	9.65	8.46
金霉素 Aureomycin						27.85	27.05	26.15

大蒜油、竹叶黄酮、黄芩黄酮、小檗碱和黄芪多糖没有抑菌圈出现。

The inhibition zones of garlic oil, bamboo leaf flavonoids, skullcapflavone, berberine and astragalus polysaccharides were not found.

10 种植物提取物对沙门氏菌的抑菌圈直径结果（表 2）表明，竹叶黄酮、黄芩黄酮、肉桂精油、苦参碱、绿原酸、牛至精油、百里香精油和大蒜油对沙门氏菌有抑菌作用，随着植物提取物浓度的增加，抑菌圈直径逐渐增大，而小檗碱和黄芪多糖对沙门氏菌无抑菌作用。以同一浓度下比较抑菌圈直径大小为原则，将植物提取物对沙门氏菌的抑菌能力由大到小依次为竹叶黄酮、黄芩黄酮、肉桂精油、苦参碱、绿原酸、牛至精油、百里香精油、大蒜油。

表 2　植物提取物对沙门氏菌的抑菌圈直径

Table 2　Inhibition zone diameters of plant extracts on the *Salmonella*　　　mm

项目 Items	不同浓度 Different concentrations/(mg/mL)										
	800	400	200	150	100	50	25	12.5	10	5	2.5
百里香精油 Thyme oil	15.67	10.41	9.47								
牛至精油 Oregano essential oil	12.39	11.26	10.39								
大蒜油 Garlic oil	11.70	10.49	9.78								
绿原酸 Chlorogenic acid			16.79	14.32	12.51						
肉桂精油 Cinnamon essential oil					22.57	15.97	11.80				
黄芩黄酮 Skullcapflavone						18.40	17.66	16.49			
苦参碱 Matrine						14.42	12.17	10.73			
竹叶黄酮 Bamboo leaf flavonoids						24.68	21.65	17.92			

金霉素 Aureomycin	33.65	31.94	29.81

小檗碱和黄芪多糖没有抑菌圈出现。

The inhibition zones of berberine and astragalus polysaccharides were not found.

2.2　植物提取物复配对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌作用

肉桂精油、苦参碱和绿原酸 3 种植物提取物不同比例复配对大肠杆菌的抑菌作用结果（表 3）表明，3 种植物提取物复合物的抑菌作用均显著高于苦参碱和绿原酸的不同浓度对照组（P＜0.05）。除肉桂精油和苦参碱复合物（25:50）及肉桂精油、苦参碱和绿原酸复合物（25:50:50）的抑菌作用与肉桂精油对照组无显著差异外（P＞0.05），其他复合物的抑菌作用均显著低于肉桂精油对照组（P＜0.05）。

表 3　植物提取物复配对大肠杆菌的抑菌作用

Table 3　Bacteriostatic effects of plant extract compounds on *Escherichia coli*　　*n*=6

项目 Items		浓度或浓度比 Concentration/(mg/mL) or concentration ratio	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm
对照 Contrast	肉桂精油 Cinnamon essential oil	25	19.31^{a}
	苦参碱 Matrine	25	8.62^{k}
		50	12.33^{i}
	绿原酸 Chlorogenic acid	50	8.57^{k}
		100	9.32^{k}
		200	10.70^{j}
复配 1:1 Compound 1:1	肉桂精油：苦参碱 Cinnamon essential oil:matrine	25:25	16.28^{bcd}
复配 1:2 Compound 1:2		25:50	19.80^{a}
复配 1:1 Compound 1:1	肉桂精油：绿原酸 Cinnamon essential oil:chlorogenic acid	25:25	14.07^{h}
复配 1:2 Compound 1:2		25:50	14.22^{gh}
复配 1:4 Compound 1:4		25:100	15.44^{def}
复配 1:8		25:200	16.66^{bc}

Compound 1:8			
复配 1:1:1 Compound 1:1:1	肉桂精油：苦参碱：绿原酸 Cinnamon essential oil:matrine：chlorogenic acid	25:25:25	15.99^{cde}
复配 1:1:2 Compound 1:1:2		25:25:50	16.67^{bc}
复配 1:1:4 Compound 1:1:4		25:25:100	15.05^{efg}
复配 1:1:8 Compound 1:1:8		25:25:200	14.66^{fgh}
复配 1:2:1 Compound 1:2:1		25:50:25	17.11^{b}
复配 1:2:2 Compound 1:2:2		25:50:50	18.84^{a}
复配 1:2:4 Compound 1:2:4		25:50:100	15.11^{efg}
复配 1:2:8 Compound 1:2:8		25:50:200	14.39^{gh}
SEM			0.346
P 值 *P*-value			<0.000 1

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05)。下表同。

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05). The same as below.

竹叶黄酮、黄芩黄酮和肉桂精油 3 种植物提取物不同比例复配对沙门氏菌的抑菌作用结果（表 4）表明，竹叶黄酮和黄芩黄酮的不同浓度复合物的抑菌作用均显著低于相应浓度竹叶黄酮和黄芩黄酮对照组（*P*＜0.05)；除竹叶黄酮和肉桂精油的复合物（25:25）及竹叶黄酮、黄芩黄酮和肉桂精油的复合物（25:25:25 和 25:50:25）的抑菌作用与 25 mg/mL 竹叶黄酮和 100 mg/mL 肉桂精油对照组无显著差异外（*P*＞0.05），竹叶黄酮和肉桂精油其他比例的复合物及 3 种植物提取物其他比例的复合物的抑菌作用均显著高于 3 种植物提取物的不同浓度对照组（*P*＜0.05），并以竹叶黄酮和肉桂精油的复合物（25:100）的抑菌效果最好，显著高于其他复合物（*P*＜0.05）。

根据竹叶黄酮和肉桂精油不同比例复配对沙门氏菌的抑菌效果，筛选出最佳复配比例，结果见表 5。由表可见，竹叶黄酮和肉桂精油的复合物中，随着肉桂精油所占比例的增加，复合物对沙门氏菌的抑菌作

用增强，以竹叶黄酮和肉桂精油的复合物（25:150）的抑菌效果最好，虽与竹叶黄酮和肉桂精油的复合物（25:200）无显著差异（$P>0.05$），但显著高于其他复合物（$P<0.05$）。结果表明，竹叶黄酮和肉桂精油的复配比例为 1:6 时，对沙门氏菌的抑菌作用最强。

表 4　植物提取物复配对沙门氏菌的抑菌作用

Table 4　Bacteriostatic effects of plant extract compounds on *Salmonella*　　n=6

项目 Items		浓度或浓度比 Concentration (mg/mL) or concentration ratio	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm
对照 Contrast	竹叶黄酮 Bamboo leaf flavonoids	25	20.64^{e}
	黄芩黄酮 Skullcapflavone	25	18.69^{f}
		50	18.66^{f}
	肉桂精油 Cinnamon essential oil	25	12.20^{i}
		50	17.67^{f}
		100	21.54^{e}
复配 1:1 Compound 1:1	竹叶黄酮：黄芩黄酮 Bamboo leaf flavonoids:skullcapflavone	25:25	15.98^{g}
复配 1:2 Compound 1:2		25:50	14.45^{h}
复配 1:1 Compound 1:1	竹叶黄酮：肉桂精油 Bamboo leaf flavonoids:cinnamon essential oil	25:25	21.42^{e}
复配 1:2 Compound 1:2		25:50	23.50^{d}
复配 1:4 Compound 1:4		25:100	30.08^{a}
复配 1:1:1 Compound 1:1:1	竹叶黄酮:黄芩黄酮:肉桂精油 Bamboo leaf flavonoids:skullcapflavone:cinnamon essential oil	25:25:25	20.48^{e}
复配 1:1:2 Compound 1:1:2		25:25:50	23.66^{cd}
复配 1:1:4		25:25:100	25.07^{b}

Compound 1:1:4		
复配 1:2:1 Compound 1:2:1	25:50:25	20.88^{e}
复配 1:2:2 Compound 1:2:2	25:50:50	24.22^{bcd}
复配 1:2:4 Compound 1:2:4	25:50:100	24.88^{bc}
SEM		0.513
P 值 *P*-value		<0.000 1

表 5　竹叶黄酮和肉桂精油复配对沙门氏菌的抑菌作用

Table 5　Bacteriostatic effects of bamboo leaf flavonoids and skullcapflavone compounds on *Salmonella*

n=6

项目 Items		浓度或浓度比 Concentration (mg/mL) or concentration ratio	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm
对照 Contrast	竹叶黄酮 Bamboo leaf flavonoids	25	19.19^{j}
	肉桂精油 Cinnamon essential oil	100	21.99^{i}
		125	23.02^{i}
		150	25.18^{h}
		175	25.95^{gh}
		200	26.53^{g}
		225	26.76^{g}
		250	26.91^{fg}
复配 1:4 Compound 1:4	竹叶黄酮：肉桂精油 Bamboo leaf flavonoids:cinnamon essential oil	25:100	28.01^{ef}
复配 1:5 Compound 1:5		25:125	28.39^{de}
复配 1:6 Compound 1:6		25:150	31.37^{a}

复配 1:7 Compound 1:7	25:175	30.14[bc]
复配 1:8 Compound 1:8	25:200	30.72[ab]
复配 1:9 Compound 1:9	25:225	29.47[cd]
复配 1:10 Compound 1:10	25:250	29.81[bc]
SEM		0.423
P 值 *P*-value		<0.000 1

3 讨　论

3.1 植物提取物对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌作用

本研究发现，肉桂精油、苦参碱、绿原酸、百里香精油和牛至精油对大肠杆菌具有抑菌作用，而大蒜油、竹叶黄酮、黄芩黄酮、小檗碱和黄芪多糖对大肠杆菌无抑菌作用。大量研究表明，肉桂精油、苦参碱、绿原酸、百里香精油和牛至精油对大肠杆菌均具有抑菌作用。肉桂精油内的肉桂醛对大肠杆菌有较强的抑菌作用[24]，肉桂精油作用于大肠杆菌时，能破坏大肠杆菌的细胞膜，使细胞内部的多种酶不能正常合成，影响其新陈代谢，从而抑制了大肠杆菌的生长[25]。苦参碱可使鸡大肠杆菌菌体变形，细胞质固缩，质壁分离，菌体中央出现空腔，使细菌死亡[26]。1.0 g/L 的金银花中绿原酸的抑菌效果明显，其对大肠杆菌的抑菌圈直径为 25.95 mm[27]。百里香精油也对大肠杆菌有抑菌作用，其对大肠杆菌的抑菌圈直径为 15.6 mm[28]，最小抑菌浓度（MIC）为 1.12 mg/mL[12]。王新伟等[29]研究表明，牛至精油对大肠杆菌有明显的抑菌作用，其 MIC 为 0.125 μL/mL。这些结果与本试验研究结果基本一致。另外，研究发现，黄芪多糖对大肠杆菌无抑菌作用[30]或抑菌效果较差[31]。赵志刚等[18]研究表明，小檗碱对革兰氏阴性菌的抑菌作用较差。李凤清[32]也发现大蒜油对大肠杆菌并无抑菌作用。这些结果也与本试验研究结果相一致。也有研究表明，竹叶黄酮[33]和黄芩黄酮[15]对大肠杆菌有不同程度的抑菌作用，而本试验中并未发现相似的结果，这可能是由于不同试验所使用的菌株及植物提取物产品的不同造成的。陆志科等[34]在研究不同竹叶提取物的抑菌效果时发现，不同的产地和采摘时间会影响抑菌效果。

本研究表明，竹叶黄酮、黄芩黄酮、肉桂精油、苦参碱、绿原酸、牛至精油、百里香精油和大蒜油对沙门氏菌均有抑菌作用，而小檗碱和黄芪多糖对沙门氏菌无抑菌作用。有关竹叶黄酮对沙门氏菌抑菌作用的研究还较少。研究发现，竹叶黄酮对沙门氏菌有抑菌作用，其对乙型副伤寒沙门氏菌的抑菌圈为 11.78 mm[35]；黄芩黄酮对伤寒沙门氏菌的 MIC 为 1.88 mg/mL[36]；肉桂精油对沙门氏菌也表现出抑菌作用，其

MIC 为 400 mg/L[37]。韩铁索[38]研究发现，苦参碱对沙门氏菌表现出抑菌作用，其 MIC 为 0.003 1 g/mL。徐跃成[19]报道，金银花中提取的绿原酸对沙门氏菌有抑菌效果，其 MIC 为 0.125 mg/mL。研究认为，百里香精油对沙门氏菌有一定的抑菌作用，其抑菌圈直径为 16 mm[39]；大蒜油对沙门氏菌有较强的抗菌作用[40]。林清华等[13]也报道，牛至油对 10 株沙门氏菌有抑菌作用，其 MIC 为 111~400 mg/mL。这些前人研究结果与本研究结果相似，说明这些植物提取物对沙门氏菌具有不同程度的抑菌作用。研究表明，小檗碱对革兰氏阴性菌的抑菌效果较差[18]；黄芪多糖对沙门氏菌并无抑菌作用[30]或抑菌效果较差[31]。这些研究与本试验研究结果也基本一致。

3.2 植物提取物复配对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌作用

研究发现，植物提取物复配可以增强其抑菌效果。张瑾[41]研究表明，大蒜、丁香和肉桂以质量比 8:8:1 复配时，苦参、大黄和金银花以质量比 5:4:8 复配时，均对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有更强的抑菌作用。莫小路等[42]报道，肉桂、香茅和广藿香精油等量混合对大肠杆菌有较强的抑菌作用。Lu 等[43]也证实，肉桂精油和百里香精油复配可以增强对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌效果；但肉桂精油和丁香油复配可降低对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌作用。也有研究认为，肉桂精油和丁香油对大肠杆菌的抑菌作用表现出拮抗作用，而对沙门氏菌的抑菌作用表现出协同作用[44]。可见，植物提取物复配是否增强其抑菌效果，与参与复配植物提取物的种类和比例以及供试菌种均有很大关系。目前为止，关于肉桂精油、苦参碱和绿原酸复配以及肉桂精油、竹叶黄酮和黄芩黄酮复配对大肠杆菌和沙门氏菌的体外抑菌作用的研究，尚未见报道。本研究表明，将肉桂精油、苦参碱和绿原酸两两或 3 种植物提取物按不同比例复配时，其复合物对大肠杆菌的抑菌作用并未大于单一肉桂精油，但竹叶黄酮和肉桂精油两两复配增强了对沙门氏菌的抑菌作用，且竹叶黄酮和肉桂精油以 1:6 复配时，其抑菌作用达到最大。产生这一结果的原因有待进一步研究。

4 结 论

① 10 种植物提取物中有 5 种对大肠杆菌有抑菌作用，其抑菌作用从大到小依次为肉桂精油、苦参碱、绿原酸、百里香精油、牛至精油，而大蒜油、竹叶黄酮、黄芩黄酮、小檗碱和黄芪多糖对大肠杆菌无抑菌作用；8 种植物提取物对沙门氏菌具有抑菌作用，其抑菌作用从大到小依次为竹叶黄酮、黄芩黄酮、肉桂精油、苦参碱、绿原酸、牛至精油、百里香精油、大蒜油，而小檗碱和黄芪多糖对沙门氏菌无抑菌作用。

②肉桂精油、苦参碱和绿原酸两两或 3 种植物提取物复配对大肠杆菌的抑菌作用并未大于单一肉桂精油；竹叶黄酮和肉桂精油复配可增强对沙门氏菌的抑菌作用，且在复配比例为 1:6 时抑菌作用达到最大。

参考文献：

[1] 张丁华.中药复方制剂对鸡三种细菌性疾病的防治研究[D].硕士学位论文.郑州:河南农业大学,2010.

[2] 毛红霞,武书庚,张海军,等.植物提取物在动物生产中的应用进展[J].中国畜牧兽医,2010,37(7):24–29.

[3] 刘学剑.植物提取物饲料添加剂开发应用的影响因素及对策[J].饲料工业,2007,28(16):59–61.

[4] 程桂林,徐淑芳,刘凤华,等.大蒜挥发油对猪鸡四种常见致病菌的抗菌效果[J].动物营养学

报,2009,21(4):554–560.
[5] 汤法银,裴亚玲,陈燕杰.牛至油和小檗碱联用对产 ESBLs 鸡大肠埃希菌的体外抗菌试验[J].中国兽医杂志,2012,48(6):31–33.
[6] 佟建明,高徽徽,萨仁娜,等.植物黄酮 MPB6 的抗菌活性及对肉仔鸡生产性能的影响[J].中国畜牧杂志,2002,38(3):23–24.
[7] 许钦坤,赵翠燕.黄芪多糖对鸡腹泻主要致病菌的抑菌作用[J].黑龙江畜牧兽医,2012(18):98–99.
[8] 石念进,王希春,吴金节,等.中药复方多糖提取方法优化及对家禽主要致病菌的体外抑菌作用[J].中国家禽,2011,33(23):28–32.
[9] 胡文举,宋艳画,吴伶俐.黄连素和黄芪多糖对鸡源大肠杆菌的体外联合抑菌作用[J].中兽医学杂志,2013(6):8–10.
[10] 刘胜贵,许方美,张兰兰,等.植物提取物体外抑菌试验的方法研究[J].怀化学院学报,2006,25(2):65–67.
[11] MO X L,WANG Y S,ZENG Q Q,et al.Antifungal activity study of several essential oils[J].Natural Product Research and Development,2005,17(6):696–699.
[12] VARDAR-ÜNLÜ G,CANDAN F,SÖKMEN A,et al.Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae)[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2003,51(1):63–67.
[13] 林清华,刘波,徐有为,等.牛至挥发油对肠炎常见菌的体外抗菌作用[J].应用与环境生物学报,1997,3(1):76–78.
[14] 贾佳,吴艳,苏莉芬,等.迷迭香精油和肉桂精油抗菌活性研究[J].黑龙江医药,2015,28(1):8–11.
[15] 曾超珍,刘志祥,韩磊.黄芩总黄酮提取技术及其抑菌活性研究[J].时珍国医国药,2009,20(6):1342–1343.
[16] 游辉.竹叶黄酮的分离提纯及其抑菌性能研究[D].硕士学位论文.北京:北京林业大学,2009.
[17] 刘永录,于瑞,张国祖,等.pH 值对碱法提取黄芪多糖收率的影响及黄芪多糖体外抑菌作用研究[J].河南农业科学,2010,39(5):117–119.
[18] 赵志刚,徐小军,庄洁,等.盐酸小檗碱、鱼腥草素钠和大蒜素的体外抗菌活性[J].中国临床药理学杂志,2005,21(2):119–121.
[19] 徐跃成.金银花中绿原酸的提取分离及其抑菌作用研究[D].硕士学位论文.重庆:重庆大学 2008.
[20] 陈度煌.苦参生物碱体外抗菌活性研究[J].中国动物保健,2010,12(1):28–30.
[21] 魏希颖,金品,左海艳.两种不同培养基对连翘种子挥发油体外抑菌作用的研究[J].中药材,2004,27(1):44–45.
[22] CLSI. CLSI M07 A9 Ed. 9 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically[S].Clinical and Laboratory Standards Institute,2012.

[23] 姚火春.兽医微生物学实验指导[M].2 版.北京:中国农业出版社,2002.
[24] FRIEDMAN M,HENIKA P R,MANDRELL R E.Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* enterica[J].Journal of Food Protection,2002,65(10):1545–1560.
[25] BURT S.Essential oils:their antibacterial properties and potential applications in foods: A review[J].International Journal of Food Microbiology,2004,94(3):223–253
[26] 王关林,唐金花,蒋丹,等.苦参对鸡大肠杆菌的抑菌作用及其机理研究[J].中国农业科学,2006,39(5):1018–1024.
[27] 张泽生,乌兰.金银花中绿原酸的体外抑菌和抗氧化性的研究[J].天津科技大学学报,2005,20(2):5–8.
[28] 张有林,张润光,钟玉.百里香精油的化学成分、抑菌作用、抗氧化活性及毒理学特性[J].中国农业科学,2011,44(9):1888–1897.
[29] 王新伟,刘欢,魏静,等.牛至油、香芹酚、柠檬醛和肉桂醛抑菌作用研究[J].食品工业,2010(5):13–16.
[30] 陈洪亮.植物多糖的制备及对肉仔鸡免疫功能影响的研究[D].博士学位论文.北京:中国农业科学院,2002.
[31] 李瑜,周玉,江冠民,等.枸杞多糖与黄芪多糖抑菌活性的研究[J].现代生物医学进展,2012,12(26):5061–5063.
[32] 李凤清.植物精油的抑菌评价及其应用[D].硕士学位论文.南京:南京师范大学,2014.
[33] 李栋.竹叶黄酮的提取、纯化、鉴定及其抗氧化和抑菌活性研究[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2008.
[34] 陆志科,谢碧霞.不同种竹叶的化学成分及其提取物抗菌活性的研究[J].西北林学院学报,2005,20(1):49–52.
[35] 杨英,李英华.竹叶黄酮提取物的抑菌活性研究[J].广州化工,2011,39(16):66–68.
[36] 邓淑华,王鸿梅,刘艳华.黄芩茎叶总黄酮抗菌作用的实验研究[J].承德医学院学报,2008,25(3):324–325.
[37] 李京晶,籍保平,周峰,等.丁香和肉桂挥发油的提取、主要成分测定及其抗菌活性研究[J].食品科学,2006,27(8):64–68.
[38] 韩铁锁.TMP 对中药抗菌增效作用及其复方对免疫功能影响的研究[D].硕士学位论文.大庆:黑龙江八一农垦大学,2009.
[39] 豆丽丽.鲜鸡蛋涂膜保鲜包装技术的研究[D].硕士学位论文.天津:天津科技大学,2013.
[40] 钟英英,张译捷,玉万国.大蒜油对人肠道益生菌及有害菌的体外抗菌活性研究[J].中国调味品,2009,34(5):47–49.
[41] 张瑾.植物源杀菌剂的复配及其微乳液的制备[D].硕士学位论文.天津:天津大学,2013.

[42] 莫小路,邱蔚芬,袁亮,等.药用植物精油对植物病原真菌的抑菌效果[J].中国现代中药,2010,12(1):33–35.

[43] LU F,DING Y C,YE X Q,et al.Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil[J].Agricultural Sciences in China,2011,10(9):1482–1487.

[44] GOÑI P,LÓPEZ P,SÁNCHEZ C,et al.Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils[J].Food Chemistry,2009,116(4):982–989.

Bacteriostatic Effects of Plant Extracts and Their Compounds on the Chicken Pathogenic Bacteria *in vitro*

ZHAO Lulu LIAO Xiudong ZHANG Liyang LUO Xugang LYV Lin*

(*Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100193, *China*)

Abstracts: In this study, ten kinds of plant extracts with stronger bacteriostatic effects were selected to investigate their bacteriostatic effects *in vitro* on the chicken pathogenic bacteria (*Escherichia coli* and *Salmonella*), and three kinds of plant extracts with stronger bacteriostatic effects on one of the two pathogens were selected, respectively, and compounded in different proportions to obtain the plant extract compounds with stronger bacteriostatic effects. This study was divided into two trials. Experiment 1: eleven groups [thyme oil, oregano essential oil, cinnamon essential oil, garlic oil, skullcapflavone, bamboo leaf flavonoids, astragalus polysaccharides, berberine, matrine, chlorogenic acid and aureomycin (the positive control) group] were arranged with six replicates per group, and the bacteriostatic effects of plant extracts on *Escherichia coli* and *Salmonella* were determined by Oxford cup method. Experiment 2: according the results of experiment 1, three kinds of plant extracts (cinnamon essential oil, matrine and chlorogenic acid) with stronger bacteriostatic effects on *Escherichia coli* were screened out and compounded in different concentration ratios, respectively, and bacteriostatic effects of plant extract compounds on *Escherichia coli* were determined by Oxford cup method. At the same time, the control groups of three plant extracts in corresponding concentrations were arranged. There were twenty groups in total with six replicates per group. Three kinds of plant extracts (bamboo leaf flavonoids, skullcapflavone and cinnamon essential oil) with stronger bacteriostatic effects on the *Salmonella* were screened out, and bacteriostatic effects of the plant extract compounds in different concentration ratios and three kinds of plant extracts in corresponding concentrations (control groups) on *Salmonella* were determined by Oxford cup method. There were seventeen groups in total with six replicates per group. According to the above results, bacteriostatic effects of the compounds of bamboo leaf flavonoids and cinnamon oil in different concentration ratios on *Salmonella* were determined, and the optimal proportion of compound was selected. There were fifteen groups in total with six replicates per group. The results showed that five kinds of plant extracts had bacteriostatic effects on *Escherichia coli*, and the order of their

*Corresponding author, associate professor, E-mail: lulin1225@163.com (责任编辑 李慧英)

bacteriostatic effects from high to low was cinnamon essential oil, matrine, chlorogenic acid, thyme essential oil, oregano essential oil. In addition, eight kinds of plant extracts had bacteriostatic effects on *Salmonella*, and the order of their bacteriostatic effects from high to low was bamboo leaf flavone, skullcapflavone, cinnamon essential oil, matrine, chlorogenic acid, oregano essential oil, thyme oil, garlic oil. Compared with the cinnamon essential oil control group, the compounds of cinnamon essential oil, matrine and chlorogenic acid did not significantly improved the bacteriostatic effects on *Escherichia coli* ($P>0.05$). However, the compounds of bamboo leaf flavone and cinnamon essential oil significantly improved the bacteriostatic effects on *Salmonella* ($P<0.05$), and the bacteriostatic effects was the highest in the concentration ratio of 25:150 (1:6). In conclusion, among the ten kinds of plant extracts, three kinds of plant extracts with better bacteriostatic effects on *Escherichia coli* are cinnamon essential oil, matrine and chlorogenic acid, but the bacteriostatic effects of plant extract compounds is not stronger than that of cinnamon essential oil; and the three kinds of plant extracts with better bacteriostatic effects on *Salmonella* are bamboo leaf flavone, skullcapflavone and cinnamon essential oil, and the compounds of bamboo leaf flavone and cinnamon essential oil improve the bacteriostatic effects on *Salmonella*, and the bacteriostatic effects is the highest in the concentration ratio of 1:6.

Key words: plant extracts; *Escherichia coli*; *Salmonella*; bacteriostatic effects